Einige Untersuchungen über die Leistungsfähigkeit moderner Methoden zum Nachweis des Typhusbacillus.

Inaugural-Dissertation

verfasst und der

hohen medizinischen Facultät

der

K. Bayer. Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von

Karl Herberich

aus

Donauwörth.

ACAD. LUGD. BAT. BIBL.

Würzburg.

Anton Boegler'sche Buchdruckerei

1904.

Gedruckt mit Genehmigung der medicinischen Fakultät der Universität Würzburg.

REFERENT:
HERR PROFESSOR DR. K. B. LEHMANN.

Dem Andenken

seines verstorbenen Kollegen

Herrn Dr. C. Keller

in Weilerbach

in dankbarer Verehrung.

Der Verfasser.

Die Diagnose des Unterleibstyphus gehörte von jeher zu den schwierigsten Aufgaben der Heilkunde. Daher vergeht kaum ein Jahr, in dem nicht ein Autor eine neue Methode des Typhusnachweises ausarbeitet und veröffentlicht, indem sich ihm die Methoden seiner Vorgänger mehr oder minder als unbrauchbar erweisen. Es würde zu weit führen, alle im Laufe der Jahre erschienenen Methoden hier aufzuführen, zumal sie in bakteriologischen Lehrbüchern ausführlich beschrieben sind. Dagegen sind in neuester Zeit einige Methoden des Typhusnachweises erschienen, die zum Teil auf neuen Prinzipien fussend, sich einer weitergehenden Anerkennung erfreuen oder eine solche anstreben: es sind dies in erster Linie der v. Drigalski-Conradi'sche Nährboden, dann die aus dem Rubner'schen Institut von ROTH, HOFFMANN und FICKER stammende Coffeïn-Anreicherungs-Methode und der auf einem ähnlichen Prinzip wie der oben genannte DRIGALSKI-Nährboden basierende Nährboden des Japaners ENDO.

Von Herrn Professor Dr. K. B. LEHMANN aufgefordert, hatte ich mir vorgenommen, diese drei Methoden an der Hand grösserer Versuchsreihen einer eingehenden vergleichenden Prüfung zu unterziehen. Allein unvorhergesehene äussere Verhältnisse zwangen mich leider, die

Arbeit zu einer Zeit plötzlich abzubrechen, wo sie nicht nur sehr interessant, sondern auch besonders erspriesslich zu werden anfing. Daher erhebt auch diese Arbeit keineswegs Anspruch darauf, eine durchgearbeitete Kritik der drei Methoden zu liefern; ich muss mich leider darauf beschränken, Material oder Beiträge zu einer solchen Kritik beizubringen. Es muntern aber die bei dieser Arbeit gefundenen Resultate zu einer weiteren noch eingehenderen Prüfung der drei Methoden auf, sodass diese Arbeit das Anfangsglied einer grösseren Kette von Versuchen bilden würde, wenn sich geeignete Kräfte dafür finden.

Die Versuche begannen mit der Bereitung der Nährböden und des sonstigen Materials.

a) Nährboden von v. Drigalski und Conradi:

In 2 Liter Aq. destill. wurden 60.0 g Extract. carn. „Liebig“ gegeben und unter gelindem Erwärmen und stetigem Umschütteln gelöst. Dazu wurden gefügt 20.0 g Pepton. sicc „Witte“, 20.0 g Nutrose, 10.0 g Kochsalz. Hierauf wurde 1 Stunde lang gekocht; sodann wurden 60.0 g feingeschnittenen Stangenagars zugesetzt. Dann wurde 1 Stunde lang im Autoclaven gekocht, darnach die Lösung schwach alkalisiert und filtriert; sodann wurde sie nochmals $^1/_2$ Stunde lang gekocht.

Zu dem noch heissen Nährboden wurde zugesetzt eine Lackmus-Milchzuckerlösung, die bereitet wurde, indem 260.0 ccm Lackmuslösung von Kahlbaum in Berlin 10 Minuten lang gekocht, mit 30.0 g chemisch reinen Milchzuckers versetzt und nochmals 10 Minuten lang gekocht wurde. Nachdem diese Lösung dem heissen flüssigen Nährboden heiss zugesetzt worden war, wurde

auf die Reaktion geprüft, und dieselbe noch alkalisch befunden.

Dem so bereiteten Nährboden wurden 4.0 ccm einer heissen Lösung von 10.0 g wasserfreier Soda in 100.0 ccm Aq. destill. sterilis. zugesetzt, ferner 20.0 ccm einer 0.1 prozentigen Lösung von Krystallviolett B Höchst in warmer Aq. destill. sterilis.

Der so fertig gestellte Nährboden wurde in 250 ccm fassende Kolben gegossen, und diese, mit Wattepfropfen versehen, kühl aufbewahrt.

b) Nährboden von Endo:

In 1 Liter angewärmter Aq. destill. sterilis. wurden 10.0 g Extract. carn. „Liebig" unter Schütteln aufgelöst, dann 30.0 g feingeschnittene Stangenagars zugesetzt, diese Mischung kam für 1 Stunde in den Autoclaven bei ungefähr 2 Atmosphären. Hierauf wurden 10.0 g Pepton sicc. „Witte" und 5.0 g Kochsalz hinzugefügt, und die Mischung 1/4 Stunde lang im Autoclaven gekocht. Hierzu kamen alsdann 15.0 ccm Aq. destill. sterilis. als Ersatz des Wasserverlustes. Die so bereitete Flüssigkeit wurde mit 17.0 ccm $\frac{n}{1}$ NaOH neutralisiert, bis zum Aufwallen gekocht und durch ein doppeltes Papierfilter gehen lassen.

650.0 ccm des Filtrates wurden, noch flüssig, versetzt mit 6.5 ccm einer 10-prozentigen Sodalösung, 16.25 ccm einer 10-prozentigen Natriumsulfitlösung, 6.5 g chemisch reinen Milchzuckers und 3.25 ccm einer frisch bereiteten alkoholischen Fuchsinlösung.

Nachdem die vollständige Lösung und Mischung sich vollzogen hatten, wurde der Nährboden filtriert und in 200 ccm haltende Kolben umgefüllt und dunkel aufbewahrt.

Leider bekundete der sorgfältig vor Licht geschützte Nährboden eine grosse Empfindlichkeit gegen Wärme, sodass er nach etwa 3 Wochen diffus gerötet war.

Die Regeneration wurde in der Weise vorgenommen, dass so lange tropfenweise von einer 10-prozentigen Natriumsulfitlösung hinzugefügt wurde, bis fast vollständige Entfärbung bis auf einen leichten Stich ins Rötliche eintrat. Diese Regeneration wurde bei den einzelnen Kolben ausgeführt, wenn sie zum Zwecke des Plattengusses auf dem Wasserbad verflüssigt waren.

c) Es wurden ausserdem gewöhnlicher Agar- und Gelatinenährboden, Traubenzuckeragar und gewöhnliche sterile Nährbouillon in grosser Menge aus den Vorräten des bakteriologischen Institutes bei den Versuchen benützt.

I. Versuch. Dieser sollte vor allem den deutlichen Unterschied zwischen einer Typhuskolonie und einer Colikolonie auf dem v. Drigalski-Conradi'schen Nährboden darthun. Es wurden von einem Typhusstamm des Institutes „Typhus neu“, und von einem Colistamm des Institutes „Coli Edel“, je eine 24-stündige Agarstrichkultur angelegt, und von jeder dieser 3 Agarschalen in der Weise versehen, dass die erste Schale 1 Platinnadelspitze von der Strichkultur, die zweite Schale 3 Oesen vom Material der ersten, die dritte Schale 11 Oesen von der zweiten Verdünnung enthielt. Nach 15 Stunden zeigten sich die Schalen mit der zweiten Verdünnung am besten für den bestimmten Zweck gewachsen; sie zeigten vereinzelte isoliert stehende grosse Kolonieen.

Von der Typhusagarschale wurde 1 Oese Kolonie auf eine mit Rücksicht auf die Angabe Abels in seinem „Taschenbuch für den bacteriologischen Praktikanten“ auf Seite 71, dass die Schichtdicke mindestens 2 cm betragen müsse, recht dicke v. Drigalski-Conradi'sche Schale ausgestrichen.

Auf einen zweiten ebenso dicken Plattenguss wurden 3 Oesen einer Aufschwemmung von 1 Oese Typhuskolonie in 2.5 ccm Bouillon aufgestrichen.

Auf einem gleich dicken dritten Plattenguss gelangten 3 Oesen einer Aufschwemmung von 1 Oese Colikolonie in 2.5 ccm Bouillon zum Oberflächenausstrich.

Die 3 Schalen kamen, nachdem sie 1/2 Stunde offen stehen geblieben waren, in den Brütschrank, wo sie bei 37° C 16.5 Stunden verblieben. Darnach ergab sich bei der Besichtigung folgendes:

Bei den beiden Typhusschalen war der Nährboden bei auffallendem Licht blau, bei durchfallendem zeigte er jedoch einen starken rötlichen Schimmer; die Kolonieen waren bei auffallendem Licht graublau, bei durchfallendem rötlich. Bei der Colischale war der Nährboden bei durchfallendem Licht ungefähr 3—4 mm um die Kolonieen herum etwas deutlicher rot gefärbt, wie an sonstigen Stellen, wo er sich nicht von dem der beiden ersten Platten unterschied, wie er sich auch bei auffallendem Licht durch die Färbung nicht vom Nährboden der Typhusschalen unterschied. Auch die Kolonieen der Colischale zeigten gleiche Färbung wie die Typhuskolonieen.

II. Versuch. Nun wurden im Glauben, dass Kolonieen von Typhus und Coli, wenn sie sich neben einander auf einer Drigalskischale befänden, einen besseren Farbenunterschied gäben, Mischkulturen angelegt. Ohne die Ergebnisse dieses Versuches im Einzelnen wiederzugeben, darf hier bemerkt werden, dass von einem befriedigenden Resultat desselben auch nicht annähernd die Rede sein konnte; die Kolonieen waren durch ihre Farbe einfach nicht zu unterscheiden.

III. Versuch. Es darf daher als ein glücklicher Zufall betrachtet werden, dass bei einem weiteren Versuche mit Mischkulturen eine Drigalskischale etwas schief erstarrte, sodass die Schichtdicke auf einer Seite nur etwa 5 mm betrug. Hier erschien der Nährboden bei durch-

fallendem Licht schön dunkelblau, die Kolonieen aber wiesen deutlich verschiedene Färbung auf: es waren rötliche auf rotem Grund deutlich von bläulichen auf blauem Grund zu unterscheiden. Letztere wurden durch die Agglutination durch Typhusserum in 200-facher Verdünnung mikroskopisch und makroskopisch als Typhuskolonieen erkannt, während sich die roten Kolonieen durch den positiven Ausfall der mit Zuckeragar angestellten Gährprobe als Colikolonieen erwiesen.

IV. Versuch. Dieser wurde so angeordnet, dass zwei Petrischalen nur so hoch mit dem v. Drigalski-Conradi'schen Nährboden angefüllt wurden, dass die Schichtdicke in der Mitte, wo der Boden der meisten Schalen etwas höher ist als am Rande, nur etwa 5 mm betrug. Es entsprach diese Höhe genau der Angabe von 1 cm, wie sie in der neuesten Auflage des „Atlas und Grundriss der Bacteriologie und bacteriolog. Diagnostik" von Prof. Dr. K. B. Lehmann und Priv.-Doz. Dr. Neumann bei der Beschreibung des v. Drigalski-Conradi'schen Nährbodens enthalten ist, wenn man die Schichthöhe vom Niveau der Plattenunterlage aus rechnet, also die Bodendicke dazurechnet. Mit dieser Berücksichtigung wurden, wie schon erwähnt, 2 Petrischalen gegossen, von denen die eine mit 1 Oese Typhusaufschwemmung, die andere mit 1 Oese Coliaufschwemmung zum Oberflächenausstrich versehen wurde. Der Erfolg dieses Versuches war ein vollkommener; denn die Typhusschale hatte nur blaue Kolonieen auf blauem Nährboden, die Colischale nur rote Kolonieen auf rotem Nährboden.

Bei richtiger Anwendung des Nährbodens kann ich also die Richtigkeit des in der Arbeit von v. Drigalski und Conradi aufgestellten Satzes bestätigen:

> „Wir ersehen somit, dass in selektiver Weise eine Oberflächenkolonie von Bact. coli vorzugsweise den Milchzucker zersetzt, eine solche von Bact. typhi die Eiweissstoffe.“

Dass sich der v. Drigalski-Conradi'sche Nährboden auch bei Mischkulturen bewährte, werden spätere Versuche zeigen.

Weitere Untersuchungen wurden am Endo'schen Nährboden vorgenommen.

V. Versuch. Es wurde die erste Endo-Schale mit 1 Oese Typhusreinkultur, die zweite mit 1 Oese Colireinkultur als Oberflächenausstrich mit dem Glasspatel versehen. Die dritte Endo-Schale wurde mit 1 Oese einer Bouillonaufschwemmung als Oberflächenaussaat versehen, welche durch je 1 Oese Typhus- und Colireinkultur in 2.5 ccm steriler Bouillon hergestellt wurde; die vierte Endo-Schale wurde mit 1 Oese Bouillonaufschwemmung versehen, die bereitet wurde, indem von der vorigen Bouillonaufschwemmung 3 Oesen in 2 ccm steriler Bouillon aufgeschwemmt wurden.

Die vier Schalen blieben an staubfreiem, vor Licht geschütztem Ort 1/4 Stunde lang offen stehen und kamen dann in den Brütschrank von 37 ° C. Nach 14 1/2 Stunden zeigte sich folgendes: Die Typhusschale hatte weisse Kolonieen auf farblosem Nährboden; die Colischale zeigte rote Kolonieen auf farblosem Nährboden; die beiden Mischschalen hatten nur farblose Kolonieen auf farblosem Nährboden.

Bald war jedoch bei den vier Platten der anfangs farblose Nährboden, jedenfalls unter der Einwirkung der Wärme im Brütofen, diffus gerötet, was besonders stark bei der Schale 2, 3 und 4 der Fall war; es wollte indess nicht gelingen, auf den beiden Mischplatten rotumrandete Kolonieen von farblos umrandeten zu unterscheiden.

VI. Versuch. Die Anordnung dieses Versuches verdanke ich Herrn Professor Dr. K. B. LEHMANN. Es wurden auf einer Endo-Platte Stichkulturen in der Weise angelegt, dass 4 Reihen mit verschiedenen Abständen der Stichkulturen von einander gebildet wurden. In der ersten Reihe stand abwechselnd Coli und Typhus im jeweiligen Abstand von 1 cm; in der zweiten Reihe betrug der Abstand $^1/_2$ cm; in der dritten Reihe standen zu beiden Seiten der Typhusstichkulturen, die 1 cm von einander entfernt waren, Colistichkulturen im Abstande von je 2 mm. In der vierten Reihe betrug dieser Abstand 1, resp. 3 mm. Dann wurde die Schale $^1/_4$ Stunde lang an dunklem staubfreiem Ort offen stehen lassen und kam hierauf in den Brütschrank von 37° C.

Schon nach 5 Stunden war der Unterschied zwischen Typhus- und Colistichkulturen ein sehr deutlicher, nämlich letztere dunkelrot im Centrum, hellrot in der Peripherie, erstere farblos bis auf den Stichkanal, der etwas rot gefärbt war. Beim Vergleich der vier Reihen zeigte sich, dass die erste Reihe die beste Verteilung bot, während die beiden letzten Reihen deshalb weniger günstige Verhältnisse lieferten, weil hier die Colikulturen zu dicht standen, wodurch der Nährboden gleichmässig rot wurde, da der Farbstoff in den Nährboden diffundierte.

Es müsste also für ein ideales Resultat die Aussaat so dünn gemacht werden, dass sie einer Verteilung der Kulturen in der ersten Reihe entspräche, nämlich eine ganz gleichmässige Aussaat von ungefähr 50 Typhuskeimen auf die gleiche Zahl Colikeime für 1 kleine Endo-Schale. Es muss aber zugegeben werden, dass in den ersten Stunden bei gleichmässiger Verteilung sich etwa noch 300 Typhuskeime neben 300 Colikeimen erkennen lassen.

VII. Versuch. Es wurde nun eine Endo-Schale zur Oberflächenaussaat mit 0.1 ccm einer Bouillon-

aufschwemmung versehen, die hergestellt wurde, indem von einer Originalaufschwemmung von 3 Oesen Typhusreinkultur und 1 Oese Colireinkultur in 7 ccm steriler Bouillon 2 Oesen in 7 ccm steriler Bouillon aufgeschwemmt wurden. Zugleich wurde 1 Oese der Originalaufschwemmung auf Keimzahl untersucht, indem Agarplatten mit $\frac{1}{100}$, $\frac{1}{200}$, $\frac{1}{1000}$, $\frac{1}{10000}$, $\frac{1}{20000}$ und $\frac{1}{100000}$ Oese gegossen wurden.

Nach 24-stündigem Aufenthalt im Brütofen von 37° C zeigten alle Zählplatten eine so grosse Kolonieenzahl, dass eine Keimzählung nicht stattfinden konnte. Aber auch die Endo-Platte zeigte zahlreiche kleine Kolonieen, die alle rötlich gefärbt erschienen. Nach abermals 24 Stunden zeigte die Endo-Platte 3 Arten von Kolonieen auf rötlichem Nährboden:

1) grosse rot gefärbte Kolonieen,
2) kleine rötlich gefärbte Kolonieen,
3) grosse weiss gefärbte Kolonieen.

Von diesen drei Arten wurde je eine Zuckeragarschüttelkultur zwecks Gärprobe angelegt; diese fiel bereits nach 2 Stunden bei allen dreien positiv aus; ebenso fehlte bei allen dreien die Agglutination bei einer Verdünnung von 1 : 10, ein merkwürdiges aber ganz sicher erhobenes Resultat.

Weitere specielle Untersuchungen über die Brauchbarkeit des Endo'schen Nährbodens schienen nach diesen Versuchen überflüssig zu sein; deshalb wurde dieser Nährboden bei den weiteren Versuchen nur noch zur Unterstützung der durch die Gärprobe gewonnenen Resultate benützt.

Wir gingen nun zu Versuchen über, welche die Leistungsfähigkeit der aus dem Rubner'schen Institut von Roth-Hoffmann-Ficker stammenden Coffeïn-Anreicherungsmethode prüfen sollten. Ich darf mich in dieser Arbeit, der ein ausführlicheres Protokoll zu Grunde

liegt, mit der einmaligen Beschreibung der Bereitung der Coffeïnanreicherungsflüssigkeit begnügen, zumal die einzige, dabei in Frage kommende, variable Grösse, ich meine die Acidität der Fleischwasserstammlösung, bei den einzelnen Bereitungen wesentlichen Schwankungen nicht unterlag.

Zunächst wurde die Fleischwasserstammlösung nach Vorschrift hergestellt, indem 2 Pfund zerkleinertes Rindfleisch in einem Emailtopf mit 2 Litern destillierten Wassers übergossen und darin tüchtig verteilt wurden. Dann wurde der Topf mit Inhalt gewogen, und das Gewicht auf 3365 g festgestellt. Hierauf wurde der Inhalt auf 54° C erwärmt und 1/2 Stunde unter stetigem Umrühren und Abreiben des Bodens mit dem Glasstab auf dieser Temperatur belassen. Hierauf wurde unter stetem Umrühren mit dem Glasstab bis zum Kochen erhitzt und 1/2 Stunde kochen lassen. Dann wurde nach dem Erkalten gewogen, und der Rest, 3204 g, durch 161 g Aq. dest. sterilis. wieder zu 3365 g ergänzt. Das Dekokt wurde dann durch ein doppeltes Papierfilter gehen lassen; dann gemessen, mit 6 Prozent Pepton. sicc. „Witte“ und 0.5 Prozent Kochsalz versetzt, erhitzt bis zur Lösung des Peptons, abermals durch ein doppeltes Papierfilter gehen lassen und in grossen sterilen Erlenmeyerkolben aufgefangen; diese wurden mit sterilen Wattepfropfen versehen und 2 Stunden im Dampf sterilisiert. Eine solche Bereitung der Fleischwasserstammlösung war im Ganzen zweimal nötig.

So oft nun eine Coffeïnanreicherungsflüssigkeit hergestellt werden sollte, wurde zunächst die Acidität der Stammlösung irgend eines Kolbens bestimmt, indem, um ein Beispiel zu wählen, mittels steriler Pipette 25 ccm der Stammlösung mit destilliertem Wasser verdünnt mit $\frac{n}{10}$ Na OH titriert wurde, wobei 3—5 Tropfen Phenolphthaleïn als Indikator zugefügt waren; dabei

wurde Rotfärbung durch 11.6 ccm $\frac{n}{10}$ NaOH erreicht, was für 100 ccm Stammlösung durch 4.64 ccm $\frac{n}{1}$ NaOH erreicht würde. Von diesem Neutralisationspunkt soll aber die Acidität der Stammlösung so weit entfernt sein, dass nur 38.64 Prozent der zur Neutralisation nötigen 4.64 ccm $\frac{n}{1}$ NaOH nach Vorschrift zugesetzt werden; dieses waren in unserem Beispiel für 100 ccm der mittels sterilen Masscylinders in einen sterilen grossen Erlenmeyerkolben übertragenen Stammlösung 1.79 ccm, rund 1.8 ccm $\frac{n}{1}$ NaOH. Nach deren Zusatz wurde 10 Minuten lang im Dampf sterilisiert. Der wieder erkalteten Stammlösung wurde zugesetzt eine Lösung von mit sterilem Porcellanlöffel zerkleinertem, auf steriler Schale abgewogenem 1.26 g Coffeïn, mit sterilem Glasstab übertragen, in angewärmter Aq. dest. sterilisat. in der Menge von 105 ccm, sodass eine 1.2 prozentige Lösung erhalten wurde. Sodann wurden noch 1.4 ccm einer Lösung von 0.1 g auf steriler Reibschale mittels sterilen Glasstabs zerkleinerten Krystallvioletts B Höchst in 100.0 ccm angewärmter Aq. destill. sterilis. zugesetzt.

VIII. Versuch. Um die anreichernde Wirkung des Coffeïns auf Typhusbakterien zu prüfen, wurde so vorgegangen, dass eine Keimzählung vor und nach der Anreicherung vorbereitet wurde. Zu diesem Zwecke wurden zunächst 2 Kolben mit der in oben angegebener Weise hergestellten Coffeïn-Anreicherungsflüssigkeit versehen. In den einen Kolben kam 1 Oese einer 24-stündigen Typhusagarstrichkultur, in den anderen Kolben 1 Oese einer 24-stündigen Coliagarstrichkultur; dann wurden beide Kolben kräftig umgeschüttelt. Von jedem der beiden Kolben wurden sofort 3 Agarplatten gegossen, die erste mit 0.5 ccm der Anreicherungsflüssigkeit, die zweite mit 0.5 ccm der 100-fachen, die dritte mit 0.5 ccm der 10000-fachen Verdünnung derselben. Dann kamen

die zwei Kolben und die 6 Agarschalen in den Brütofen von 37° C. Nach 13 Stunden wurden die zwei Kolben aus dem Brütofen entfernt, und da die Besichtigung aller 6 Agarplatten ein so starkes Wachstum ergibt, dass eine Zählung der Kolonieen auch auf den Platten mit der 10000-fachen Verdünnung unmöglich war, wurden nur noch je zwei Agarplatten gegossen, und zwar mit $\frac{0.5}{100}$ ccm und $\frac{0.5}{10000}$ ccm der Anreicherungsflüssigkeiten. Nach 72 Stunden wurden diese 4 Platten mit den entsprechenden vor der Anreicherung gegossenen verglichen: es konnte ein Unterschied in der Menge der Typhuskolonieen nicht konstatiert werden, während die Colikolonieen auf den nach der Anreicherung gegossenen Platten entschieden weniger zahlreich waren.

IX. Versuch. Er wurde in der Weise angesetzt, dass wieder ein Coffeïn-Anreicherungskolben mit 1 Oese Typhusreinkultur, und ein zweiter Kolben mit 1 Oese Colireinkultur versehen wurde. Nach kräftigem Umschütteln wurden von jeder Anreicherungsflüssigkeit 2 Agarplatten gegossen, von denen die beiden ersten $\frac{0.1}{100}$ ccm, die beiden zweiten $\frac{0.1}{10000}$ ccm der Anreicherungsflüssigkeit enthielten. Nach 15-stündigem Aufenthalt der Anreicherungskolben und der 4 Agarschalen im Brütofen bei 37° C, zeigten sich trotz der starken Verdünnung die 4 Platten wegen zu grosser Kolonieenzahl zum Zählen nicht geeignet. Dennoch wurden 4 Parallelplatten mit den entsprechenden Verdünnungen gegossen. Nach drei Tagen lehrte die Vergleichung der 8 Platten, dass eine bedeutende Zunahme der Typhuskeimzahl, eine ganz bedeutende Abnahme der Colikeimzahl nach der Anreicherung stattgefunden hatte.

X. Versuch. 5 grosse Erlenmeyerkolben wurden steril mit der wie oben frisch hergestellten Coffeïn-

anreicherungsflüssigkeit versehen, und in jeden eine Einsaat mit je 1 Oese einer 24-stündigen Agarstrichkultur von den Stämmen des Institutes: „Typhus neu", „Typhus alt", „Coli Edel" und „Coli β polaris" gemacht. Der 5. Kolben blieb unbesät und diente als Kontrollkolben.

Unmittelbar nach der Einsaat wurden die 12 ersten Zählplatten in folgender Weise angelegt: Von jeder der tüchtig geschüttelten Coffeïnanreicherungen, die inficiert worden waren, wurden 3 Agarzählplatten gegossen, die erste mit $\frac{1}{10000}$ ccm, die zweite mit $\frac{1}{2000000}$ ccm, die dritte mit $\frac{1}{10000000}$ ccm der Anreicherungsflüssigkeit. Dann kamen Schalen und Kolben, letztere für 13 Stunden in den Brütschrank von 37° C. Darnach wurden die 12 Parallelplatten in analoger Weise gegossen. Vom Kontrollkolben wurden nun auch zwei Platten angelegt, eine mit 1.0 ccm, eine zweite mit $\frac{1}{100}$ ccm der Anreicherungsflüssigkeit.

Nach zwei Tagen wurde die Zählung der 24 Platten vorgenommen, welche für 1 ccm der Anreicherungsflüssigkeit ergab:

	vor der 13-stündigen Anreicherung		nach
„Typhus neu":	1.100.000	Keime	170.000
„Typhus alt":	1.500.000	„	280.000
„Coli Edel":	500.000	„	160.000
„Coli β polaris":	750.000	„	0

61 Stunden nach Inficierung der Coffeïn-Anreicherungsflüssigkeiten wurde noch je 1 Platte mit $\frac{1}{10000}$ ccm derselben gefertigt. Nach zwei Tagen weist nur die mit „Typhus neu" geimpfte Platte 1 Keim auf. Die jetzt mit je 1.0 ccm der Anreicherungsflüssigkeit gegossenen Gelatineplatten, sowie die Kontrollplatten blieben dauernd unbewachsen.

Waren also die beiden ersten mit ungenügend

verdünntem Material gegossenen Plattenserien im Sinne von RUBNER ausgefallen, so musste ich beim drittten technisch wohlgelungenen Versuche mit Bedauern konstatieren, dass nicht nur bei Coli, sondern auch bei Typhus eine analoge Abnahme zu verzeichnen war.

Nun wurden weitere Versuche angestellt, die eine Kombination der Coffeïn-Anreicherungs-Methode mit dem v. Drigalski-Conradi'schen Nährboden bildeten. Der Anfang wurde mit einem künstlichen Typhusstuhl gemacht.

XI. Versuch. Gewöhnlicher Stuhl, etwa 1 g, wurde auf steriler Reibschale mit sterilem Glasstab zuerst tüchtig verrieben, dann etwa 1 ccm steriler 1.2-prozentiger Coffeïnlösung hinzugesetzt und darin der verriebene Stuhl mit dem vorher gebrauchten Glasstab innig vermengt und aufgeschwemmt. Diese Aufschwemmung wurde dann durch ein steriles Wattefilter gehen lassen und in sterilem Reagenzglas aufgefangen. Vom Filtrat wurden 0.9 ccm mittels steriler Pipette in einen Coffeïn-Anreicherungskolben übertragen und darin durch kräftiges Umschütteln fein verteilt. In analoger Weise wurde ein zweiter Coffeïn-Anreicherungskolben mit 0,9 ccm Filtrat versehen; in diesem Falle waren aber dem Stuhl, etwa 1 g, vor seiner Verreibung auf der Schale mit dem Glasstab 3 Oesen einer Agarstrichkultur von „Typhus alt" zugesetzt worden, welche zur feinen Verteilung im Stuhl gelangten.

Nachdem beide Anreicherungskolben 13 Stunden lang im Brütofen von 37° C verweilt waren, wurde von beiden nach kräftigem Umschütteln je ein hängender Tropfen angefertigt, der spärliches Wachstum bei beiden ergab. Deshalb wurden von beiden nach Vorschrift je 6 v. Drigalski-Conradi'sche Schalen in folgender Weise versehen: Schale 1, 3 und 5 wurde mit 3, 2 und 1 Tropfen der Anreicherungsflüssigkeit zum Oberflächenausstrich mit

dem rechtwinkelig abgebogenen Glasstab versehen. Schale 2, 4 und 6 wurden als Verdünnungsschalen angelegt, indem sie mit dem nicht gereinigten Glasstab, der beim Ausstrich auf der vorherigen Platte verwendet worden war, bestrichen wurden. Darnach blieben die 12 Schalen $1/2$ Stunde lang an staubfreiem Ort offen stehen und kamen dann in den Brütschrank von 37° C.

Schon nach 16 Stunden zeigten besonders die Platten 1, 3 und 5 üppiges Wachstum. Die erste Serie ohne Typhus zeigte sehr viele rote Kolonieen auf rotem Grund und nur vereinzelte blaue Kolonieen. Von je 1 roten und blauen Kolonie wurde dann eine Agarstrichkultur angelegt. Verdünnungsplatten dieser Serie zeigten wenige rote Kolonieen. Die zweite Plattenserie, der Typhusbakterien beigemischt waren, zeigten rote und blaue Kolonieen im Zahlenverhältnis von 2:1, sonst wie die erste Serie auf den Platten 1, 3 und 5 reichliches, auf den Verdünnungsplatten 2, 4 und 6 spärliches Wachstum. Es wurde von jeder der 6 Platten 1 rote und 1 blaue Kolonie abgestochen und je 1 Agarstrichkultur davon angelegt.

Nach 24 Stunden wurden die gewachsenen Reinkulturen geprüft und gefunden, dass sämtliche von roten Kolonieen stammenden Reinkulturen mit Zukeragar positive Gährprobe lieferten. Die blauen Kolonieen, resp. die von ihnen stammenden Reinkulturen wurden auf Agglutination durch Typhusserum untersucht, und gefunden, dass zunächst bei der von der blauen Kolonie der ersten Plattenserie gewonnenen Reinkultur die Agglutination auch bei der nur 10-fachen Verdünnung des Serums ausblieb, aber auch die Gährprobe negativ ausfiel; sie entsprach etwa dem Bact. alcaligenes (Pet.) L. u. N., wurde aber leider nicht weiter untersucht. Bei den von den blauen Kolonieen der zweiten Plattenserie gewonnenen Agarstrichkulturen trat die Aggluti-

nation durch 200-fach verdünntes Serum, und zwar bei allen, schon nach 1/4 Stunde ein.

XII. Versuch. Nachdem der vorige Versuch die Brauchbarkeit des v. Drigalski-Conradi'schen Nährbodens bei Anwesenheit reichlicher Typhuskeime neben viel Coli bewiesen hatte, wurde ein wirklicher Typhusstuhl untersucht, der uns von der medizinischen Universitätsklinik gütigst überschickt wurde. Ungefähr 1 g des festen Stuhles wurde auf steriler Reibschale mit sterilem Glasstab zuerst kräftig zerrieben, sodann ungefähr 2 ccm einer sterilen 1.-2-prozentigen Coffeïnlösung zugefügt, und der Stuhl darin noch weiter verrieben und aufgeschwemmt. Die Aufschwemmung wurde dann durch sterile Watte filtriert. Von dem im sterilen Reagenzglas aufgefangenen Filtrat wurden 0.9 ccm mittels steriler Pipette in einen wie oben bereiteten Coffeïn-Anreicherungskolben übertragen und durch kräftiges Umschütteln darin fein verteilt. Dann kam der Kolben in den Brütschrank von 37° C. Nach 13 Stunden wird von der sorgfältig geschüttelten Anreicherungsflüssigkeit ein hängender Tropfen gefertigt, der nur eine spärliche Individuenzahl ergibt; deshalb wurden 6 grosse Drigalski-Schalen angelegt, von denen die 1. mit 7 Tropfen (=0.35 ccm), die 3. mit 4 Tropfen (=0.2 ccm) und die 5. mit 2 Tropfen (=0.1 ccm) der Anreicherungsflüssigkeit zum Oberflächenausstrich mit dem Glasspatel beschickt wurde. Platten 2, 4 und 6 wurden in der beim XI. Versuch beschriebenen Weise als Verdünnungsplatten von 1, 3 und 5 angelegt.

Schon nach 17 Stunden waren die 3 unverdünnten Platten übersät von roten und blauen Kolonieen. Die Verdünnungsplatten zeigten in gelungener Verteilung neben zahlreichen roten Kolonieen mässige Mengen blauer. Von diesen 3 Platten wurde je 1 blaue Kolonie zur Reinkultur auf schräg erstarrtem Agar abgestochen,

ebenso noch 2 blaue Kolonieen von der 3. Platte und 1 rote Kolonie von der 2. Platte. Diese Reinkulturen wurden am nächsten Tage untersucht. Die von der roten Kolonie gewonnene lieferte mit Zuckeragar schon nach 2 Stunden eine positive Gärprobe. Von den von den blauen Kolonieen stammenden Reinkulturen lieferten 4 schon nach $^1/_2$ Stunde deutliche makroskopische Agglutination durch 200-fach verdünntes Typhusserum. Die fünfte wurde nicht agglutiniert, auch nicht durch nur 10-fach verdünntes Serum, lieferte aber auch negative Gärprobe.

Auf den Vorschlag des Herrn Professor Dr. K. B. Lehmann wurde bei den weiteren Versuchen nun auch der Endo'sche Nährboden in der Weise verwendet, dass er bei der Identificierung der typhusverdächtigen Kolonieen zur Befestigung der bei der Gärprobe gewonnenen Resultate benutzt wurde.

XIII. Versuch. Dieser wurde an einem Stuhl vorgenommen, dem eine bestimmte Zahl von Typhuskeimen beigemengt wurde. Es wurde zunächst eine leicht getrübte Aufschwemmung von 2 Oesen einer 24-stündigen Agarstrichkultur von „Typhus neu" in ungefähr 2.5 ccm steriler Bouillon hergestellt. 1 Oese dieser Aufschwemmung wurde alsdann auf ihre Keimzahl untersucht, indem 12 Zählplatten derart angelegt wurden, dass je 1 Agar- und je 1 Gelatineplatte $\frac{1}{100}$, $\frac{1}{1000}$, $\frac{1}{10000}$ etc. bis $\frac{1}{10\,000\,000}$ Oese enthielt.

Sofort nach Anlage der Zählplatten wurde je eine Stuhleinsaat in zwei vorher frisch bereitete Coffeïn-Anreicherungsflüssigkeiten gemacht. Dickflüssiger Stuhl wurde in steriler Reibschale wie oben behandelt und in 1 Teil Coffeïnlösung aufgeschwemmt und durch sterile Watte filtriert. Vom Filtrat wurden 0.9 ccm zu der ersten Anreicherungsflüssigkeit (Kolben I) übertragen

und darin durch Umschütteln aufgeschwemmt. Erst dann wurden 5 Oesen von der Bouillonaufschwemmung zugefügt und unter Schütteln verteilt. Vom Rest des Filtrates wurde 1 ccm mittels steriler Pipette in ein steriles Reagenzglas übertragen; hierin wurden dann 3 Oesen der Bouillonaufschwemmung verteilt. 0.9 ccm dieses mit Typhusbakterien inficierten Stuhlfiltrates wurde in die zweite Anreicherungsflüssigkeit (Kolben II) übertragen und darin unter Schütteln verteilt. Hierauf kamen die beiden Kolben in den Brütschrank von 37° C.

Nach 13 Stunden wurde vom Kolben I ein hängender Tropfen gefertigt, der spärliches Wachstum ergab; deshalb wurden von diesem Kolben 5 grosse und 1 kleine Drigalski-Schale derart geimpft, dass auf der 1. Schale 7 Tropfen (=0.35 ccm), auf der 3. Schale 5 Tropfen (=0.25 ccm) und auf der 5. Schale 3 Tropfen (=0.15 ccm) der Anreicherungsflüssigkeit zum Oberflächenausstrich mit dem Glasspatel gelangten. Platten 2, 4 und 6, letztere in einer kleinen Schale, waren Verdünnungsplatten von 1, 3 und 5. Analog wurden vom Kolben II Platte 1, 2, 3 und 5 als grosse, Platte 4 und 6 als kleine Drigalski-Schalen angelegt.

Die Besichtigung der beiden Plattenserien wurde nach 18 Stunden vorgenommen und ergab reichliche Kolonieen auf den 6 unverdünnten Platten, spärliche Kolonieen auf den 3 grossen Verdünnungsschalen, kein Wachstum auf den 3 kleinen Verdünnungsschalen. Auf den Platten, die vom Kolben I stammten, war die Kolonieenzahl deutlich grösser als auf denen vom Kolben II. Auf letzterem befanden sich aber die grösseren Kolonieen. Aeusserst merkwürdig musste es erscheinen, dass sämtliche Kolonieen blau waren und sich von einander, ausser vielleicht durch die Grösse, nicht unterschieden. Auch der Nährboden war nirgends rot gefärbt.

Nun wurde von jeder der 9 grossen Schalen eine beliebige, isoliert stehende, möglichst grosse Kolonie abgestochen und auf schräg erstarrten Agar zur Reinkultur aufgestrichen. Nach 24 Stunden waren die 9 Reinkulturen gewachsen und wurden nun nach folgenden 3 Methoden untersucht:

1) Gärprobe, mit Zuckeragar angestellt, ist noch nach 3 Tagen bei sämtlichen 9 Reinkulturen negativ.

2) 9 Endo-Schalen wurden in der Weise verwendet, dass immer in das Centrum 1 Stich mit „Coli β polaris“, darum im Abstande von 1 cm Stiche mit je einer der 9 Reinkulturen angelegt wurden. Schon nach 3 Stunden waren bei sämtlichen Schalen die im Centrum gelegenen Stichkulturen rot, die herumliegenden farblos, nach etwa 24 Stunden war der Unterschied noch sehr deutlich.

3) Die Agglutinationsprobe wurde mit sämtlichen 9 Reinkulturen mit 200-fach verdünntem Typhusserum angestellt und fiel bei einzelnen schon nach ½ Stunde, bei den meisten nach 1 Stunde, bei allen nach 2 Stunden positiv aus.

Die bei den Agarzählplatten nach 3 Tagen, bei den Gelatinezählplatten nach 6 Tagen abgeschlossene Zählung ergab im Mittel für 1 Oese Aufschwemmung 240.000 Keime, also 1200 Keime für 1 ccm der Anreicherungsflüssigkeit des Kolbens I, etwa 700 Keime für 1 ccm des Inhaltes des Kolbens II.

XIV. Versuch. Bei der nun angestellten Wasseruntersuchung wurde zunächst 900 ccm Leitungswasser stark verunreinigt, indem darin 1 Oese gewöhnlichen Stuhles aufgeschwemmt wurde; ausserdem wurde eine eben getrübte Aufschwemmung von Bact. fluorescens in 2 ccm Bouillon durch Schütteln darin fein verteilt. Dieses stark verunreinigte Wasser wurde zuerst auf

seine Keimzahl untersucht, indem je 1 Agar- und 1 Gelatineplatte mit 1, $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{100}$, $\frac{1}{1000}$ und $\frac{1}{10\,000}$ ccm des zu untersuchenden Schmutzwassers gegossen wurde.

Hierauf wurden dem verunreinigten Wasser 5 Oesen einer Aufschwemmung von 2 Oesen einer 24-stündigen Reinkultur von „Typhus alt" in 2 ccm steriler Bouillon zugesetzt. Die Keimzahl dieser 5 Oesen wird bestimmt, indem je 1 Agar- und je 1 Gelatineplatte mit $\frac{1}{100}$, $\frac{1}{1000}$, $\frac{1}{10\,000}$ und $\frac{1}{100\,000}$ Oese gegossen wurde.

Dem so verunreinigten typhushaltigen Wasser wurde unter beständigem Schütteln eine Lösung von 5.0 g Coffeïn in 20.0 ccm Aq. destill. sterilis. zugesetzt, die auf 56° C abgekühlt war, und der eine Lösung von 10 g Nutrose in 80 ccm Aq. destill. sterilis. zugefügt worden war. Dann wurden allmälig unter beständigem Schütteln 10.0 ccm einer 0.1 prozentigen Lösung von Krystallviolett B Höchst in warmer Aq. destill. sterilis. in Portionen von 0.5 ccm zugesetzt. Dann kam der Kolben in den Brütschrank von 37° C.

Nach 12½ Stunden wurde der Kolben aus dem Brütofen entfernt, sein Inhalt gut umgeschüttelt, und 5 Oesen desselben auf 1 grossen Drigalski-Schale mit dem Glasspatel ausgestrichen. Der Kolben kam dann in den Eisschrank, die Schale in den Brütofen, nachdem sie ½ Stunde lang an staubfreiem Ort offen stehen geblieben war. Bereits nach 15 Stunden konnten 3 blaue Kolonieen von ungefähr 100 roten unterschieden werden. Es wurde dann von den 3 blauen Kolonieen und von 3 roten isoliert stehenden Kolonieen je 1 Reinkultur auf schräg erstarrtem Agar angelegt. Als nach 24 Stunden sich die Reinkulturen entwickelt hatten, waren sogleich 2 von blauen Kolonieen stammende als Reinkulturen von Bact. fluorescens zu erkennen. Die übrigen 4 Reinkulturen wurden untersucht:

1) Mit der Gärprobe: Die von den 3 roten Kolonieen stammenden 3 Reinkulturen gaben in Zuckeragar positive Gärprobe, die von der blauen Kolonie stammende Reinkultur nicht.

2) Mit dem Endo-Nährboden: Stichkulturen von den aus den 3 roten Kolonieen angelegten Reinkulturen waren nach 5 Stunden im Centrum rot, die von der blauen Kolonie auf derselben Platte farblos.

3) Mit der Agglutinationsmethode: Diese ergab schon nach 1 Stunde bei der von der blauen Kolonie gewonnenen Reinkultur Agglutination durch 200fach verdünntes Typhusserum; bei den übrigen Reinkulturen trat diese nicht ein, auch nicht durch nur 10fach verdünntes Serum.

Die Ergebnisse der Zählungen der Wasserkeime vor dem Typhuszusatz, die bei den Agarplatten 3, bei den Gelatineplatten 6 Tage nach der Einsaat abgeschlossen wurden, sind auf Grundlage der Zählung von 3 Agar- und 3 entsprechenden Gelatineplatten kurz folgende:

Es befanden sich im Mittel in 1 ccm des zu untersuchenden Wassers 64.333 Keime vor dem Typhuszusatz.

Die zu derselben Zeit angesetzte Zählung der Typhuskeime ergab für 1 Oese im Mittel 42 500 Keime, das sind in 1 ccm des untersuchten Wassers 213 Keime.

Es konnte also der Typhusbacillus in stark verunreinigtem Wasser nachgewiesen werden, in welchem auf 1 Typhuskeim 303 andere Keime kamen.

Das Resultat der aus meinen bisherigen Versuchen gewonnenen Ergebnisse lässt sich in folgenden Sätzen zusammenfassen:

1. Der von v. Drigalski und Conradi angegebene Nährboden gestattet schon nach 15—18 Stunden eine deutliche Unterscheidung der Coli-Kolonie von den

Kolonieen des Bact. typhi und ähnlicher aus Milchzucker nicht Säure bildender Bakterien.

2. Die Schichtdicke des Nährbodens soll nicht zu gross sein, etwa 5 mm in der Mitte der Schale.

3. Die grossen Schalen erlauben besonders mit dem Glasspatel, wie ihn v. DRIGALSKI in seiner Arbeit angegeben hat, eine ausserordentlich gleichmässige Verteilung beim Oberflächenausstrich.

4. Nach meinen bisherigen Erfahrungen stellt der von ENDO angegebene Nährboden eine wesentliche Bereicherung unserer Hilfsmittel wohl nicht dar. Sowie eine grössere Zahl von Coli-Kolonieen auf der Platte vorhanden sind, wird soviel Säure gebildet, dass die einzelnen Alkali bildenden Kolonieen in der Regel nicht auffallen. Erwähnenswert ist, dass in einem Colistamm nicht alle Kolonieen rot färbten. Es würde sich dies so erklären, dass die Milchzuckervergärung der einzelnen Individuen keine gleich grosse ist, obwohl sie alle sehr gut Traubenzucker vergären.

5. Als Parallelmethode zur Zuckeragarschüttelkultur ist die ENDO'sche auf einem hübschen neuen Gedanken beruhende wohl brauchbar. Doch gibt die Gasbildung auf Zuckeragar immer und zwar unter Umständen um Stunden früher ein Resultat, als die ENDO'sche Methode.

6. Man könnte daran denken, diese Methode zur Untersuchung der Organismen der Coli-Gruppe auf Milchzuckerangriff zu verwenden. Doch dürfte sie auch in dieser Richtung nichts ganz Neues lehren und keiner der alten Methoden absolut überlegen sein.

7. Die Coffëin-Anreicherungsmethode von RUBNER, ROTH, HOFFMANN, FICKER hat bei der speciellen Prüfung an Reinkulturen neben zwei positiven Resultaten ein negatives ergeben; doch hat sie mir zum Nachweis von Typhusbacillen in Wasser und Stuhl, kombiniert mit dem

von v. Drigalski-Conradi'schen Nährboden recht gute Resultate gegeben. Vor allen Dingen wären nun Versuche zu machen mit ähnlichen Mischungen, die einmal mit der v. Drigalski-Conradi'schen Methode direkt, das andere mal unter Einschaltung der Coffëin-Methode untersucht würden. Diese wichtigen Untersuchungen muss ich leider einem späteren Untersucher überlassen.

Zum Schlusse meiner Arbeit sei es mir gestattet, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. K. B. Lehmann, für die gütige Ueberlassung des Themas und die Anregung zu dieser Arbeit meinen aufrichtigsten Dank auszusprechen.

Lebenslauf.

Ich Karl Herberich, bayerischer Staatsangehörigkeit, bin geboren am 5. Februar 1879 zu Donauwörth als Sohn des Anstaltsdirektors I. M. Herberich in Gemünden a. M. Nach Besuch der Volksschule in Gemünden a. M. und des Gymnasiums in Aschaffenburg erwarb ich mir am 14. Juli 1898 das Reifezeugnis in Aschaffenburg und bezog im Oktober 1898 die Universität zu Würzburg, im Sommersemester 1899 die Universität zu München, im Wintersemester 1899-1900 und im Sommersemester 1900 die Universität zu Würzburg, im Wintersemester 1900-01 die Universität zu Bonn, im Sommersemester 1901 die Universität zu München, im Wintersemester 1901-02 die Universität zu Würzburg, wo ich bis zum Schlusse der ärztlichen Staatsprüfung verblieb. Dieser unterzog ich mich in Würzburg und wurde am 6. August 1903 als Arzt approbiert. Vom 22. Oktober 1903 bis 28. Januar 1904 übte ich ärztliche Praxis aus als Stellvertreter des nunmehr verstorbenen prakt. Arztes, Herrn Dr. Keller in Weilerbach (Pfalz). Seit 18. März 1904 habe ich mich als Hausarzt der Anstalt St. Josefshaus und prakt. Arzt in Gemünden a. M. niedergelassen. Vorstehende Dissertation habe ich unter der Leitung des Herrn Professor Dr. K. B. Lehmann verfasst.